BP

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07D 493/04, 417/06, 277/24, A61K 31/425, C07F 7/08, C07D 493/08, A01N 43/78, 43/90 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C07D 493/08, 321:00, 313:00)

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19086

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1997 (29.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05080

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1996 (18.11.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 42 986.9 17. November 1995 (17.11.95) DE
196 39 456.2 25. September 1996 (25.09.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KIFFE, Michael [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

(54) Bezeichnung: EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to epothilone derivatives and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

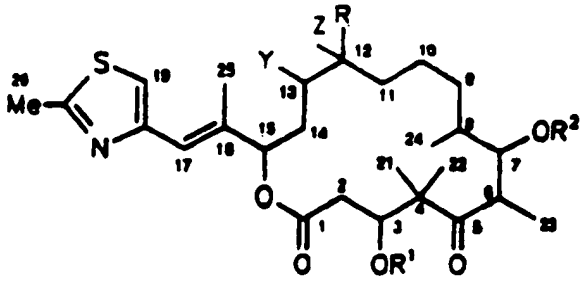
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

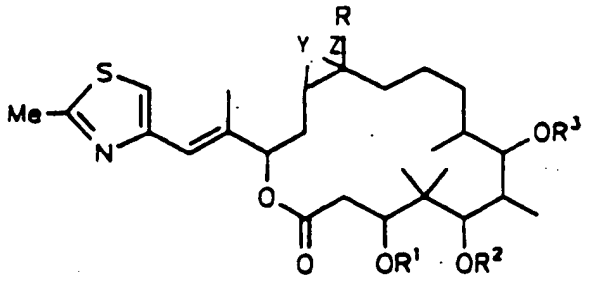
AM	Armenien
AT	Österreich
AU	Australien
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentrale Afrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CS	Tschechoslowakei
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
ES	Estland
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabon
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenya
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LR	Liberia
LT	Litauen
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
MX	Mexiko
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SG	Singapur
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
SZ	Swasiland
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
UG	Uganda
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam

EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

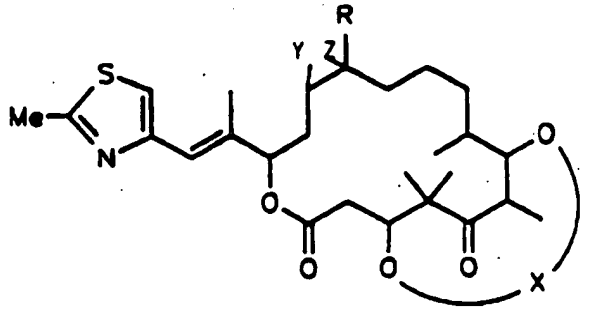
Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.



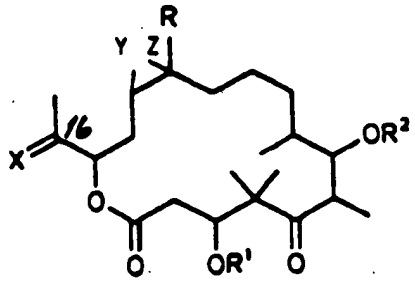
1



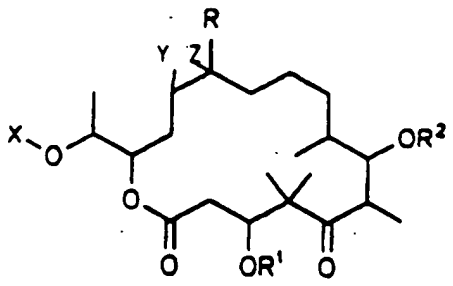
2



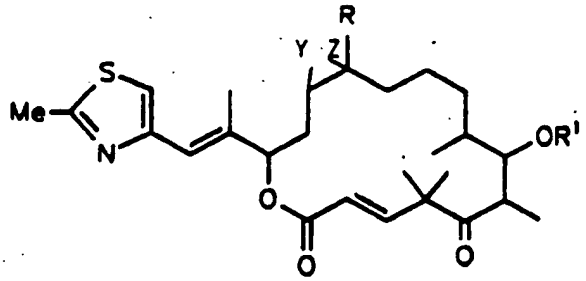
3



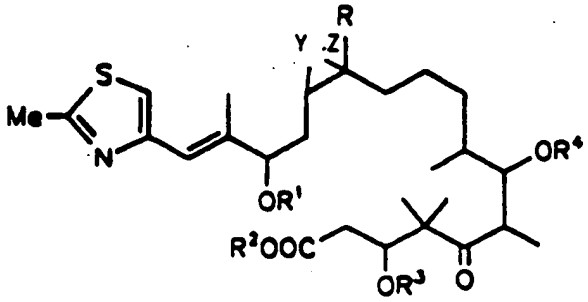
4



5



6



7

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C_{1-4}-Alkyl;
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-Alkyl,
C_{1-6}-Acyl-Benzoyl,
C_{1-4}-Trialkylsilyl,
Benzyl,
Phenyl,
C_{1-6}-Alkoxy-,
C_6-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
wobei auch zwei der Reste R^1 bis R^5 zu der Gruppierung $-(CH_2)_n-$ mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;
Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder $-N_3$, OH, O-(C_{1-6})-Acyl, O-(C_{1-6})-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$, wobei R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben, und $-SiR_2-$, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR^3, $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C_{1-18}-Alkyl, C_{1-18}-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042. Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH_3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit $NaBH_4$ in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH_3/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Method n von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:
Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 µl (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I
4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 $[M-H_2O]^+$), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2478

Isomer II

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2475

Beispiel 2:
Verbindung 1b

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46

IR (Film): ny = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M^+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$ ber.: 529.2265 für [M^+], gef.: 529.2280

Beispiel 3:
Verbindung 1c

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 µl (1.081 mmol) Triethylamin und 20 µl (0.517 mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15 °C werden dem Reaktionsgemisch 40 µl (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15 °C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7 µl (0.047 mmol) Triethylamin, 2 µl 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 µl (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M^+]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: $C_{29}H_{40}O_9NSCl$ ber.: 613.2112 für [M^+]
gef.: 613.2131

Beispiel 4:
Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).
Ausbeute: 1 mg (9 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (.) = 543 (3 [M^+]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: $C_{27}H_{42}O_6NSCl$ ber.: 543.2421 für [M^+]
gef.: 543.2405

Beispiel 5:
Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M^+]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: $C_{26}H_{41}O_6NS$ ber.: 495.2655 für [M^+]
gef.: 495.2623

Beispiel 6:
Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 µl (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): lambda$_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M$^+$]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M$^+$]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm^{-1}.

UV (Methanol): lambda$_{max}$ (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M$^+$]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M$^+$]
gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)
R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M^+]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M^+]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M^+]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ ber.: 539.2011 für [M^+]
gef.: 539.1997

Beispiel 7:
Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M^+]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

Hochauflösung: $C_{21}H_{34}O_7$ ber.: 398.2305 für [M^+]
gef.: 398.2295

Beispiel 8:
Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelost, mit 27 µl (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und über

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, SCh), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M^+]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_5NS$ ber.: 475.2392 für [M^+]
gef. 475.2384

Beispiel 9:
Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M^+]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: $C_{27}H_{37}O_6NS$ ber.: 503.2342 für [M^+]
gef.: 503.2303

Beispiel 10:
Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanol-lösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M^+]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: $C_{28}H_{39}O_6NS$ ber.: 517.2498 für [M^+]
gef.: 517 2492

Beispiel 11:
Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.
Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M^+]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: $C_{23}H_{37}O_4NS$ ber.: 423.2443 für [M^+]
gef.: 423.2410

Beispiel 12:
Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH_3/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: $C_{29}H_{45}O_8NS$ ber.: 567.2866 für [M^+]
gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 µl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40 µl Triethylamin und 16 µl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

Beispiel 15:
Epothil n C und D als Ausgangsverbindungen

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent.

B. Produktion mit DSM 6773

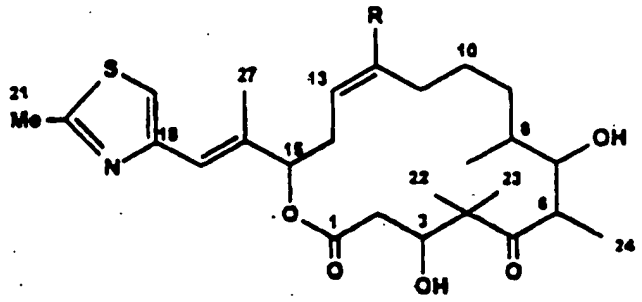
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.1 % $MgSO_4 \times 7H_2O$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m^3 Luft/h. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO_2 bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m^2, 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methan 1/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit R_t = 90-95 min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute v n jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C R = H
Epothilon D R = CH_3

Epothilon C

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]
ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für $[M+H]^+$

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82
DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 11,5 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
Fluß: 1ml/min
Detection: Diodenarray

Epothilon D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]
ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für $[M+H]^+$

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82
DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 15,3 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
Fluß: 1ml/min
Detection: Diodenarray

Tabelle: ^{1}H-und ^{13}C-NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in $[D_6]$DMSO bei 300 MHz

	Epothilon C			Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H_3	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H_3	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H_3	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H_3	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H_3	0.90			0.91	27	14.1
26-H_3				1.63		
27-H_3	2.10			2.11		

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 15:

Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

Ausbeute:

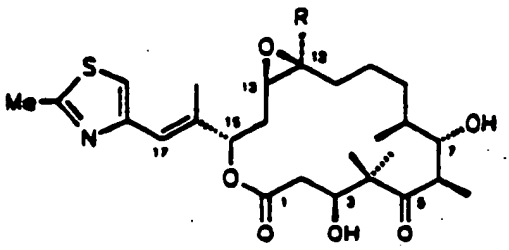
25 mg Epothilon A, R_t = 3,5 min (analyt. HPLC, 7 µm, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, R_t = 3.7 min, ESI-MS (pos. Ionen)

m/z = 494 $[M+H]^+$

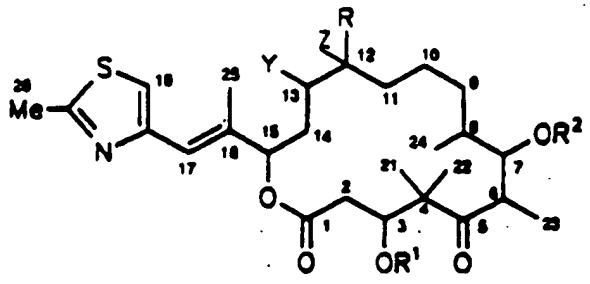
^{1}H-NMR in $[D_4]$ Methanol, ausgewählte Signale: delta = 4.32 (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A R = H

Patentansprüche

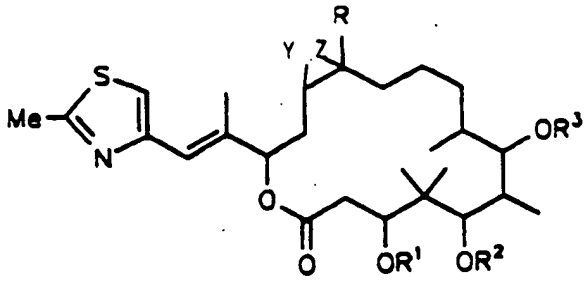
1. Epothilonderivat der Formel 1



1

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O-(C_{1-6})-Acyl, O-(C_{1-6})-Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenommen sind.

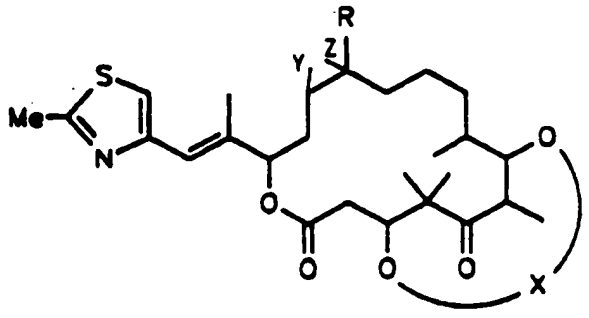
2. Epothilonderivat der Formel 2



2

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

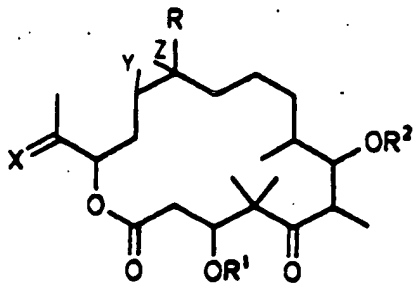
3. Epothilonderivat der Formel 3



3

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$ und $-SiR_2-$ steht, wobei R, R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben und R^1 und R^2 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

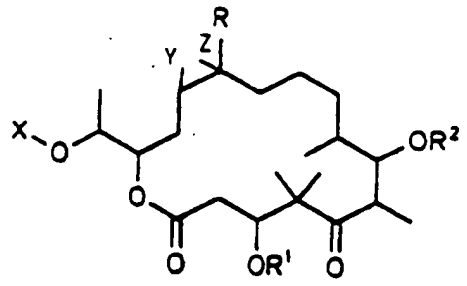
4. Epothilonderivat der Formel 4



4

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff, NOR^3, $N\text{-}NR^4R^5$, und $N\text{-}NHCONR^4R^5$ bedeutet, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben und R^4 und R^5 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und
Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

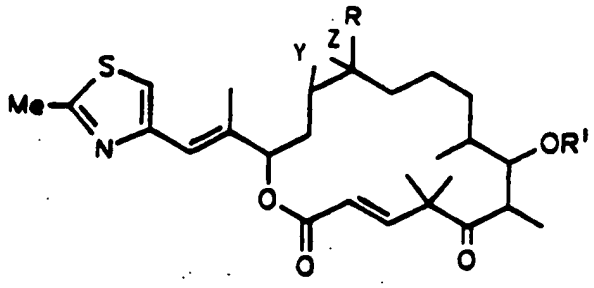
5. Epothilonderivat der Formel 5



5

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C_{1-18}-Alkyl, C_{1-18}-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und
Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

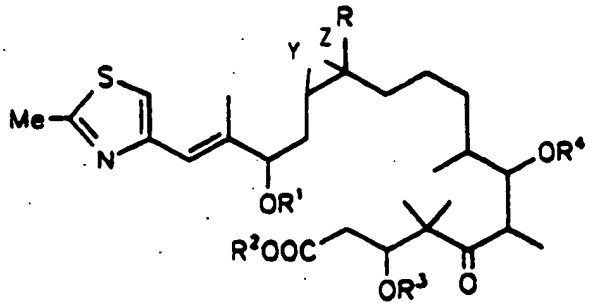
6. Epothilonderivat der Formel 6



6

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl und R^1 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy-, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

7. Epothilonderivat der Formel 7



7

wobei R = H, C_{1-4}-Alkyl und R^1, R^2, R^3, R^4 = H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Acyl, Benzoyl, C_{1-4}-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6}-Alkoxy, C_6-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch *gekennzeichnet*, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

(a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder
(b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch,
und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch *gekennzeichnet*, daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8
(a) nach der Yamaguchi-Methode oder
(b) nach der Corey-Methode oder
(c) nach der Kellogg-Methode
in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-Bisepi-epothilon A, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-Bisepi-epothilon B, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte nal Application No
PCT/EP 96/05080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07D493/04 C07D417/06 C07D277/24 A61K31/425 C07F7/08
C07D493/08 A01N43/78 A01N43/90 //(C07D493/04,313:00,
303:00),(C07D493/08,321:00,313:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07D C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISHE FORSCHUNG MBH)) 27 May 1993 see claims -----	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 February 1997	13.02.97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Henry, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

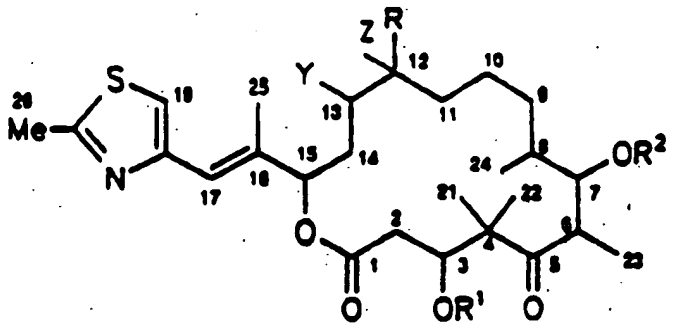
COMBINATION OF 19542986.9 (11/17/95) AND 19639456.2 (9/25/96) BP

filing date - 11/19/96

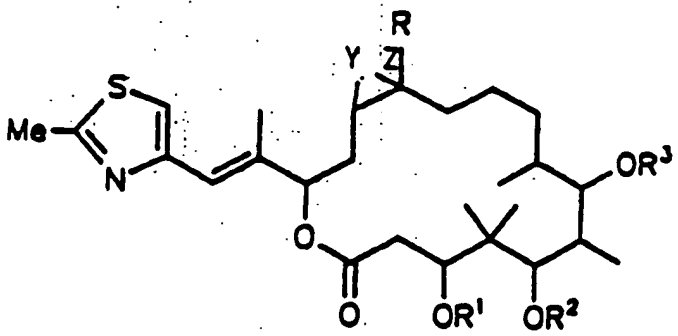
EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

CaD DERIVATIVES

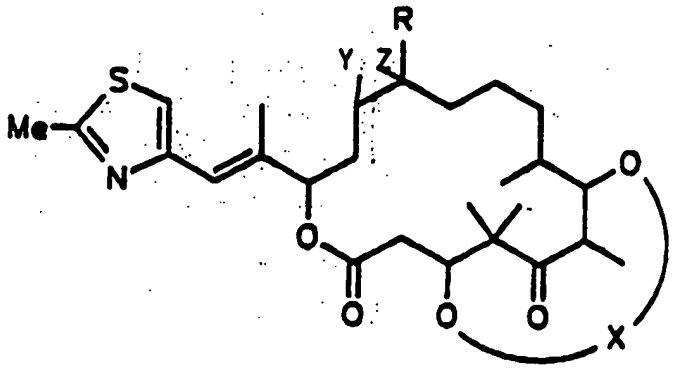
The present invention concerns general epothilone derivatives and their use for the production of drugs. Especially, the present invention is concerned with the preparation of epothilone derivatives according to the general Formulas 1 to 7 given below, as well as with their use for the production of therapeutic agents and agents for plant protection.



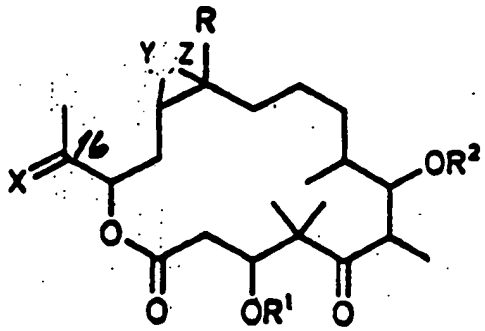
1



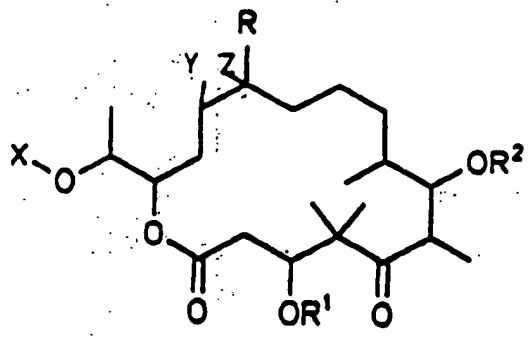
2



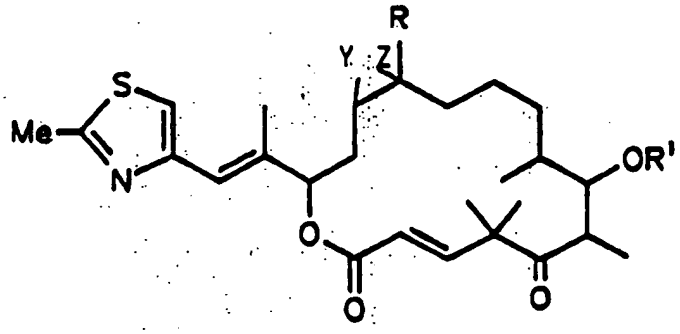
3



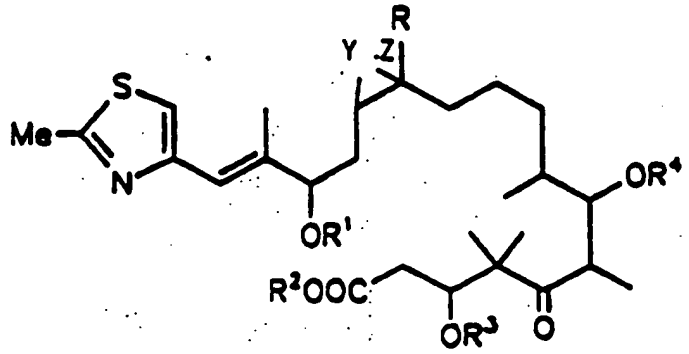
4



5



6



7

In the above **Formulas 1** to **7**, the symbols have the following meanings:

R = H, C_{1-4}-alkyl;
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-alkyl,
C_{1-6}-acyl-benzoyl,
C_{1-4}-trialkylsilyl,
benzyl,
phenyl,
C_{1-6}-alkoxy-,
C_6-alkyl-, hydroxy and halogen-substituted benzyl or phenyl;
also, two of the groups R^1 to R^5 may be combined to form the grouping $-(CH_2)_n-$ with n = 1 to 6 and the alkyl or acyl groups contained in the groups are either straight-chain or branched groups;

Y and Z are either identical or different and can stand for hydrogen, halogens, such as F, Cl, Br or I, pseudohalogens, such as -NCO, -NCS or $-N_3$, OH, O-(C_{1-6})-acyl, O-(C_{1-6})-alkyl, O-benzoyl. Y and Z can also be the O-atom of an epoxide, in which case, epothilone A and B are not claimed, or one of the C-C bonds can form a C=C double bond.

In **Formula 3**, X generally stands for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$, where R^1 and R^2 have the meaning given above and $-SiR_2-$, where R has the meaning given above.

In **Formula 4**, X stands for oxygen, NOR^3, $N-NR^4R^5$, and $N-NHCONR^4R^5$, where the groups R^3 to R^5 have the meaning given above.

In **Formula 5**, X stands for hydrogen, C_{1-18}-alkyl, C_{1-18}-acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

With regard to epothilone A and B, let us refer to DE-A-41 38 042. Compounds according to general **Formula 1** are accessible starting from epothilone A and B, as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxide. When hydrogen halides are used for this purpose in a preferred nonaqueous solvent, the halohydrins X = Hal, Y = OH and Y = OH, Y = Hal are obtained. Protonic acids, for example, toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid, lead to 12,13-diols in the presence of water and then these are

acylated subsequently according to standard methods (for example, with carboxylic acid anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or are alkylated (alkyl halides and silver oxide). For this purpose, the 3- and 7-hydroxy groups can be protected temporarily as the formate (cleaved with NH_3/MeOH) or p-methoxybenzyl ether (cleaved with DDQ).

Compounds according to general **Formula 2** are obtainable from epothilone A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by reduction, for example, with $NaBH_4$ in methanol. If the 3-OH and/or 7-OH groups are protected reversibly during this process, after acylation or alkylation, and removal of the protecting groups, 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7-O-disubstituted derivatives according to general **Formula 2** can be obtained.

Reactions of epothilone A and B with bifunctional electrophilic reagents, such as (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazole [sic], thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides or bistriflates give compounds having general **Formula 3**. The bases used as aids here can be pyridine, trialkylamine, optionally together with DMAP or 2,6-lutidine in an aprotic solvent. The 3,7-acetals having general **Formula 3** are formed by transacetalization, for example, of dimethylacetals, in the presence of an acidic catalyst.

Compounds according to general **Formula 4**, obtained from epothilone A and B or from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive processing, for example, with dimethyl sulfide. The C-16 ketones can then be converted to the oximes, hydrazones or semicarbazones according to standard methods known to the expert in the field. Furthermore, they are converted into C-16/C-17 olefins by the Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen olefination method.

The 16-hydroxy derivatives according to general **Formula 5** are obtainable by reduction of the C-16 keto group, for example, with aluminum hydride or borohydride. When the 3-OH and 7-OH groups are protected correspondingly, they can be acylated or alkylated selectively. The liberation of the 3-OH- and 7-OH groups is done, for example, with NH_3/MeOH in the case of O-formyl and with DDQ in the case of O-p-methoxybenzyl.

The compounds having general **Formula 6** are obtained from derivatives of epothilone A and B in which the 7-OH group is protected by acyl or ether groups, in which the 3-OH group is, for example, formylated, mesylated or tosylated and then eliminated by treatment with a base, for example, DBU. The 7-OH group can be liberated as described above.

Compounds having general **Formula 7** are obtained from epothilone A and B or from their 3-OH- and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, for example, with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably, the compounds having general **Formula 7** are obtained from epothilone A or B or from their 3-OH- or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, preferably with esterases or lipases. The carboxyl group can be converted into the ester by alkylation with diazoalkanes after protection of the 19-OH group.

Furthermore, compounds having **Formula 7** can be converted into the compound having **Formula 2** by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (omega-bromic acid/cesium carbonate). The corresponding methods can be found in Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (**1979**) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (**1974**) 5614; and Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (**1981**) 5183.

In order to prepare the compounds according to the invention, one can also start from epothilone C or D, and the derivatization methods described above can be used for derivatization here, too. The 12,13-double bond can be hydrogenated selectively, for example, catalytically or with diimine; or it can be epoxidized, for example, with dimethyldioxiran or a peracid; or it can be converted into the dihalides, dipseudohalides or diazides.

Furthermore, the invention is concerned with means for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or several of the epothilone derivatives described above or consisting of one or several of the epothilone derivatives described above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Finally, the invention is concerned with therapeutic agents, consisting of one or several of the compounds listed above or of one or several of the compounds listed above in addition to

one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s). These agents can exhibit especially cytotoxic activities and/or cause immunesuppression and/or can be used for combatting malignant tumors, but they can especially preferably be used as cytostatic agents.

The invention is explained further and described by the description of a few selected practical examples.

Examples

Translator's note: In the infrared spectra in the examples, the general English abbreviations are used, s, m, w, vs, b, etc., except for Sch = shoulder and ny = ν (nu) Also, the abbreviation lg stands for log.

Example 1:

Compound 1a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone A is dissolved in 1 mL of acetone, with 50 μL (0.649 mmole) of trifluoroacetic acid is added and the mixture is stirred overnight at 50°C. For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M pH 7 phosphate buffer and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer-chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) isomer I
4 mg (19%) isomer II

Isomer I

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 $[M-H_2O]^+$), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_6NS$ calculated: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$
found: 493.2478

Isomer II

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1}.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_6NS$ calculated: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$
found: 493.2475

Example 2:

Compound 1b

Epothilone A, 55 mg (0.111 mmole), is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, 0.S[sic] mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture is stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 N phosphate buffer of pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol, 90:10). Yield: 19 mg (32%).

R_f (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.46

IR (Film): ny = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M^+]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$ calculated: 529.2265 for [M^+], found; 529.2280

Example 3:

Compound 1c

12-Chloro-13-hydroxy-epothilone A (**1b**), 25 mg (0.047 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, and then 29 mg (0.235 mmole) of dimethylaminopyridine, 151 µL (1.081 mmole) of triethylamine and 20 µL (0.517 mmole) of 98% formic acid are added. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C, 40 µL (0.423 mmole) of acetic anhydride is added to the reaction mixture, followed by stirring for 70 minutes at -15°C. Since the thin-layer chromatogram did not show complete conversion, another 6 mg (0.047 mmole) of dimethylaminopyridine, 7 µL (0.047 mmole) of triethylamine, 2 µL of 98% formic acid (0.047 mmole) and 4 µL (0.047 mmole) of acetic anhydride are added to the reaction mixture, followed by stirring for 60 minutes. For work-up, the reaction mixture is heated to room temperature, 1 M phosphate buffer with pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10). Yield: 5 mg (18%).

R_f (Dichloromethane/acetone, 90-10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M^+]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: $C_{29}H_{40}O_9NSCl$ calculation: 613.2112 for [M^+]
found: 613.2131

Example 4:

Compound 1d

10 mg (0.020 mmole) of epothilone B is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, then 0.5 mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 M phosphate buffer at pH 7 is added and the aqueous phase is extracted 4 times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from solvent. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 1 mg (9%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M^+]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: $C_{27}H_{42}O_6NSCl$ calculated: 543.2421 for [M^+]
found: 543.2405

Example 5:

Compound 2a

Epothilone A, 100 mg (0.203 mmole), is dissolved in 4 mL of tetrahydrofuran/1 M phosphate buffer, pH 7 (1:1) and sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmole) is added until the thin-layer chromatogram shows that the starting material reacted completely. Then the mixture is diluted with 1 M phosphate buffer, pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done by silica gel chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 95:5 - in 5 steps to dichloromethane/acetone, 85:15).
Yield: (20%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 75:25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M^+]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

High resolution: $C_{26}H_{41}O_6NS$ calculated: 495.2655 for [M^+]
found: 495.2623

Example 6:

Compound 3a-d (a-d are stereoisomers)

Epothilone, 100 mg (0.203 mmole) is dissolved in 3 mL of pyridine, with 50 µL (0.686 mmole) of thionyl chloride added and the mixture is stirred for 15 minutes at room tempera-

ture. Then, 1 M phosphate buffer, pH 7, is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product and separation of the four stereoisomers **3a-d** is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Compound 3a

Yield: 4 mg (12%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M^+]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M^+]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]
found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M^+]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]
found: 539.2001

Compound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M^+]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7N_2$ calculated: 539.2011 for [M^+]
found: 539.1997

Example 7:

Compound 4a

Epothilone A, 10 mg (0.020 mmole), is dissolved in 2 mL of dichloromethane, cooled to -70°C and then treated with ozone for 5 minutes until a weak blue coloration develops. The resulting reaction mixture is then treated with 0.5 mL of dimethyl sulfide and heated to room temperature. In the work-up, the solvent is removed from the reaction mixture and finally the product is purified with preparative layer chromatography (solvent dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5).

Yield: 5 mg (64%)

R_f (Dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M^+]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: $C_{21}H_{34}O_7$ calculated: 398.2305 for [M^+]
found: 398.2295

Example 8:

Compound 6a

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 10 mg (0.018 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, 27 µL (0.180 mmole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred at room temperature for 60 minutes.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. After elimination of the solvent, the resulting crude product is dissolved in 1 mL of methanol, treated with 200 µL of ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3/mL of methanol) and stirred overnight at room temperature. For work-up, the solvent is removed in vacuum.

Yield: 4 mg (22%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, SCh), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M^+]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_5NS$ calculated: 475.2392 for $[M^+]$
found: 475.2384

Example 9:

Compound 6b

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 50 mg (0.091 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloroethane, 2 mL (0.013 mole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred for 12 hours at 90°C.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent removed. The purification of the crude product, which consists of two compounds, is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane-/acetone, 90:10).

Yield: 7 mg (15%)

Substance code

R_f (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 $[M^+]$), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

High resolution: $C_{27}H_{37}O_6NS$ calculated: 503.2342 for [M^+]
found: 503.2303

Example 10:
Compound 6c
3,7-Di-O-acetyl-epothilone, 5 mg (0.009 mmole), is dissolved in 1 mL of methanol, 150 μL of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3/mL of methanol) is added and the mixture stirred overnight at 50°C.

For work-up, the solvent is removed in vacuum and the crude product is purified with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1}.

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M^+]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

High resolution: $C_{28}H_{39}O_6NS$ calculated: 517.2498 for [M^+]
found 517.2492

Example 11:
Compound 7a
Epothilone, 20 mg (0.041 mmole), is dissolved in 0.5 mL of methanol, 0.5 mL of 1 N sodium hydroxide is added and the mixture stirred for 5 minutes at room temperature.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography. (Solvent: dichloromethane/methanol, 85:15).

Yield: 11 mg (52%)

R_f (Dichloromethane/methanol, 85:15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M^+]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

High resolution: $C_{23}H_{37}O_4NS$ calculated: 423.2443 for [M^+]
found: 423.2410

Example 12:

Compound 7b

5 mg (0.009 mmole) of 7-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL of methanol, 200 µL of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3/mL of methanol) is added and the mixture is stirred for 2 days at 50°C. For work-up, the solvent is removed in vacuum. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

R_f (Dichloromethane/methanol, 90:10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

High resolution: $C_{29}H_{45}O_8NS$ calculated: 567.2866 for [M^+]
found: 567.2849

Example 13:

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 20 µL of dimethyl sulfoxide and diluted with 30 mL of phosphate buffer (pH 7.1, 30 mM). After addition of 5 mg of pig liver esterase (Boehringer Mannheim), the mixture is stirred for 2 days at 30°C. It is acidified with 2 N HCl to pH 5 and the epothilonic acid 7 is extracted with ethyl acetate. The organic phase is dried with sodium sulfate and evaporated to dryness in vacuum. Yield 48 mg (96%).

Example 14:

Epothilonic acid 7, 48 mg, is dissolved in 6 mL of absolute THF and 40 µL of triethylamine and 16 µL of 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride are added under stirring. After 15 minutes, the precipitate is filtered off and, within 15 minutes, under rapid stirring, it is added dropwise to a boiling solution of 20 mg of 4-dimethylaminopyridine in 200 mL of absolute toluene. After another 10 minutes, the mixture is evaporated in vacuum and the residue is partitioned between ethyl acetate/citrate buffer (pH 4). The evaporation residue of the organic phase gives 15 mg of epothilone A after preparative HPLC separation.

Example 15:
Epothilone C and D as starting compounds

A. Production stock and culture conditions corresponding to the basic epothilone patent

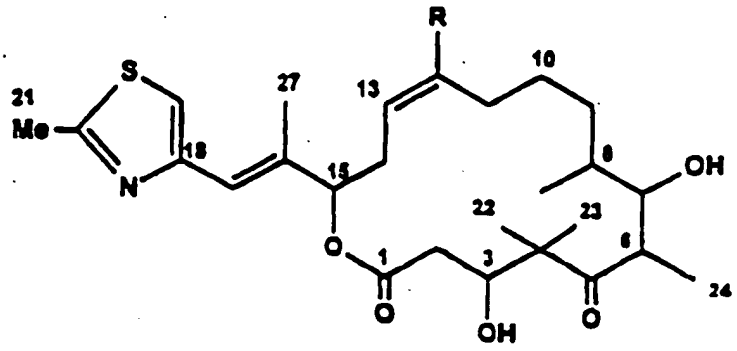
B. Production with DSM 6773

A culture, 75 L, is raised as described in the basic patent and was used for inoculating a production fermenter with 700 L of production medium consisting of 0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soy meal, 0.2% yeast extract, 0.1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 mg/L of Fe-EDTA, pH = 7.4 and optionally 15 L of adsorbent resin Amberlite XAD-16. The fermentation takes 7-10 days at 30°C, aeration with 2 m^3 of air/hour. The pO_2 is kept at 30% by adjusting the rate of rotation.

C. Isolation

The adsorber resin is separated from the culture with a 0.7 m^2, 100 mesh process filter and the polar accompanying substance is removed from it by washing with 3 bed volumes of water/methanol 2:1. Upon elution with 4 bed volumes of methanol, a crude extract is obtained, which is evaporated in vacuum until the appearance of the water phase. This is extracted three times with the same volume of ethyl acetate. Evaporation of the organic phase gives 240 g of crude extract, which is partitioned between methanol and heptane in order to remove any lipophilic accompanying substances. Thus, 180 g of raffinate is obtained from the methanol phase by evaporation in vacuum; this is fractionated into three portions on Sephadex LH-20 (volume 20 x 100 cm, 20 mL/min methanol). The epothilones are contained in the fraction eluted with a retention time of 240-300 minutes, a total amount of 72 g being obtained. To separate the epothilones, the product is chromatographed in three portions on Lichrosorb RP-18 (15 μm, column 10 x 40 cm, solvent 180 mL/minute methanol/water 65:35). After epothilone A and B, epothilone C is eluted with R_t = 90-95 minutes and epothilone D with 100-110 minutes and after evaporation in vacuum, they are obtained as colorless oils, each in an amount of 0.3 g.

D. Physical properties



Epothilone C R = H
Epothilone D R = CH_3

Epothilone C
$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]
ESI-MS: (positive ions): 478.5 for $[M+H]^+$

^1H and ^{13}C see NMR table

TLC: R_f = 0.82
TLC-aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinguishing at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: R_t: 11.5 min
Column: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm
Solvent: methanol/water = 65:35
Flow rate: 1 mL/min
Detection: diode array

Epothilone D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positive ions): 492.5 for $[M+H]^+$

^1H and ^{13}C, see NMR table

TLC: R_f = 0.82

TLC-aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinguishing at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: R_t = 15.3 min

Column: Nucleosil 100 C-18 7μm, 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min

Detection: diode array

Table: ^{1}H and ^{13}C-NMR data of epothilone C and epothilone D in [D_6 DMSO at 300 MHz

	Epothilone C			Epothilone D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H_3	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H_3	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H_3	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H_3	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H_3	0.90			0.91	27	14.1
26-H_3				1.63		
27-H_3	2.10			2.11		

*, ** Assignment interchangeable.

Example 15: [This sh uld be Example 16]

Epothilone A and 12,13-bisepi-epothilone A from epothilone C

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 1.5 mL of acetone and 1.5 mL of a 0.07 molar solution of dimethyldioxiran in acetone is added. After standing for 6 hours at room temperature, it is evaporated in vacuum and separated by preparative HPLC on silica gel (solvent: methyl-tert.butyl ether/petroleum ether/methanol 33:66:1).

Yield:

25 mg epothilone A, R_t = 3.5 min (analyt. HPLC, 7 μm, column 4 x 250 mm, solvent see above, flow rate 1.5 mL/min)

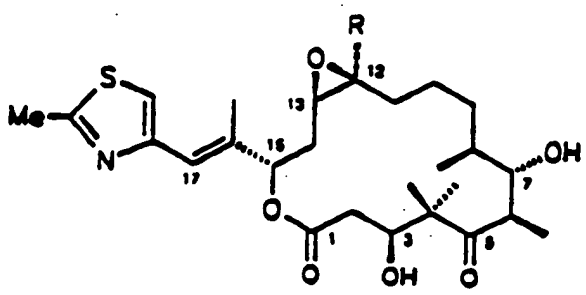
and

20 mg of 12,13-bisepi-epothilone A, R_t = 3.7 min, ESI-MS (positive ions)

m/z = 494 $[M+H]^+$

^{1}H-NMR in [D_4] methanol, selected signals:

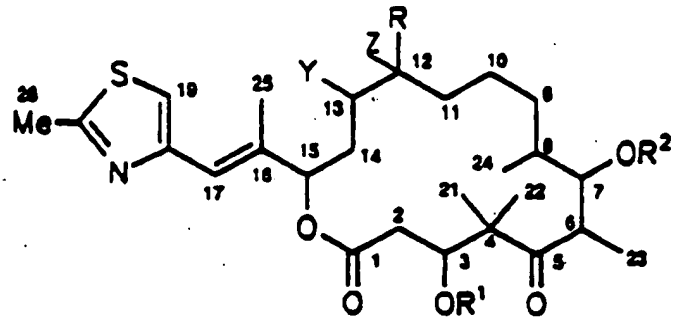
δ = 4.32 (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-bisepi-epothilone A R = H

Patent Claims

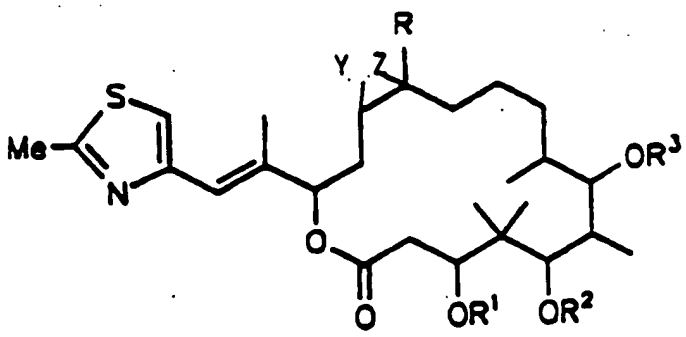
1. Epothilone derivative having Formula 1



1

where R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl and acyl groups in these groups are straight-chain or branched groups and Y and Z are either the same or different and stand for hydrogen, halogen, pseudohalogen, OH, O-(C_{1-6})-acyl, O-(C_{1-6}-alkyl or O-benzoyl or together form the O-atom of an epoxide or one of the C-C bonds form a C=C double bond, where epothilone A and B are excepted.

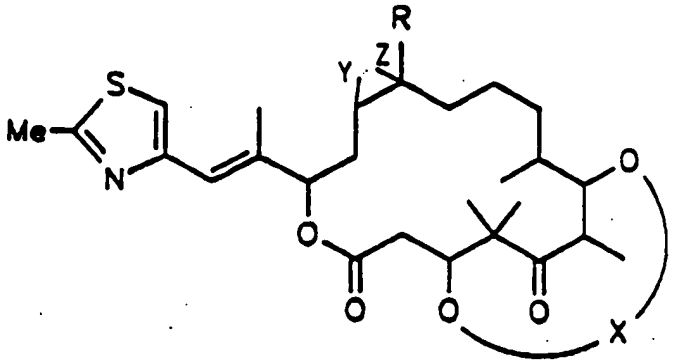
2. Epothilone derivative having formula 2



2

where R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

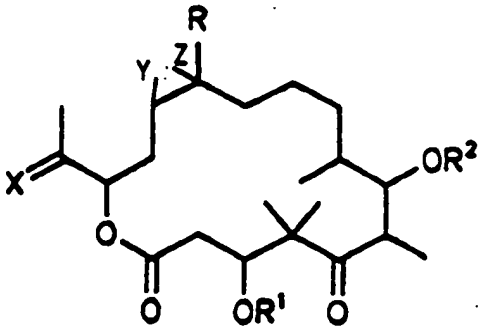
3. Epothilone derivative according to formula 3



3

where R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy-, and halogen-substituted benzyl and phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands generally for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2-$ and $-SiR_2-$, where R, R^1 and R^2 have the meaning given above and R^1 and R^2 together can also form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms; and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

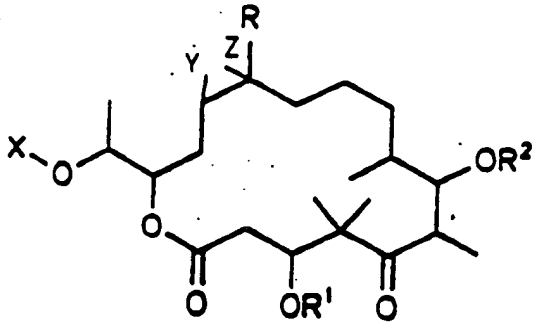
4. Epothilone derivative according to formula 4



4

where R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; X stands for oxygen, NOR^3, $N\text{-}NR^4R^5$, and $N\text{-}NHCONR^4R^5$, where the groups R^3 to R^5 have the meaning given above and R^4 and R^5 together can form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms; and
Y and Z have the meaning according to Claim 1.

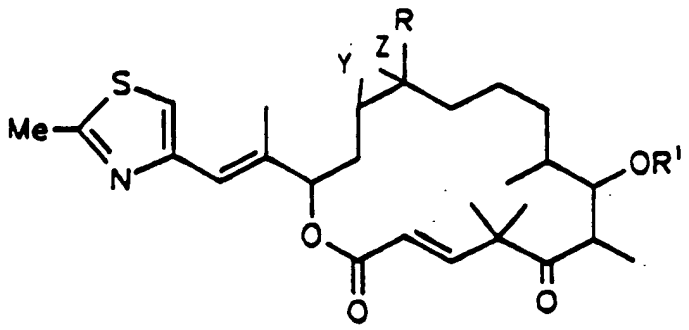
5. Epothilone derivative having formula 5



5

where R = H, C_{1-4}-alkyl; R^1, R^2 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands for hydrogen, C_{1-18}-alkyl, C_{1-18}-acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl and
Y and Z have the meaning according to Claim 1.

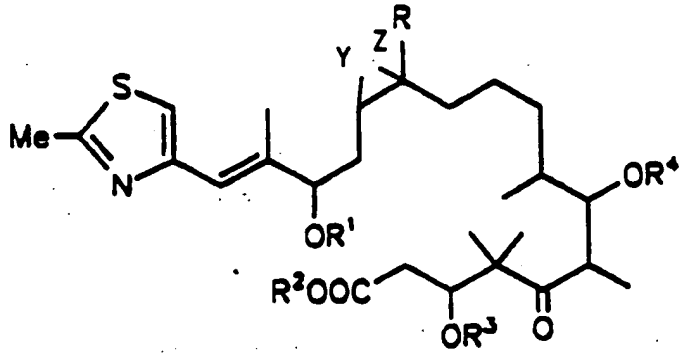
6. Epothilone derivative according to formula 6



6

in which R = H, C_{1-4}-alkyl and R^1 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; and Y and Z have the meaning given in Claim 1.

7. Epothilone derivative according to formula 7



7

in which R = H, C_{1-4}-alkyl; and R^1, R^2, R^3, R^4 = H, C_{1-6}-alkyl, C_{1-6}-acyl, benzoyl, C_{1-4}-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6}-alkoxy-, C_6-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

8. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, *characterized by the fact* that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative of these or a 7-OH-protected derivative of these is
(a) hydrolyzed enzymatically, especially with an esterase or lipase, or
(b) is hydrolyzed in an alkaline medium, especially with sodium hydroxide, in a methanol/water mixture, and the epothilone derivative having formula 7 is obtained and isolated.

9. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 2, according to Claim 2, *characterized by the fact* that an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, or as product of the method according to Claim 8, is converted into the epothilone derivative having formula 2 according to
(a) the Yamaguchi method or
(b) the Corey method or
(c) the Kellogg method
and then this conversion product is isolated.

10. Method for the preparation of epothilone A and/or 12, 13-bisepi-epothilone A, *characterized by the fact* that epothilone C is epoxidized, especially with dimethyl dioxiran or a peracid.

11. Method for the preparation of epothilone B and/or 12,13-bisepi-epothilone B, characterized by the fact that epothilone D is epoxidized, especially with dimethyldioxiran or a peracid.

12. Means for plant protection in agriculture and forestry and/or in gardening, consisting of one or several of the compounds according to one of the previous Claims, or according to one or several of these compounds together with one or several usual carrier(s) and/or diluent(s).

13. Therapeutic agent, especially for use as cytostatic agent, consisting of one or several of the compounds according to one or several of Claims 1 to 7, or one or several compounds according to one or several of Claims 1 to 7 together with one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).